***UNIVERSITE D'ALGER***

***Faculté de Médecine et de Médecine Dentaire ZIANIA (Château Neuf)***

# OUTILS DE BIOLOGIE MOLECULAIRE ET GENIE GENETIQUE

***COURS DE GENETIQUE 2015-2016***

# INTRODUCTION

- La biologie moléculaire consiste à étudier la structure des gènes, leur expression et le contrôle de leur expression.
- Elle conduit donc à travailler essentiellement avec des molécules d'ADN, et d'ARNm(expression génique).

# Plan du cours

## I-Les Enzymes

I-1 Enzymes de restriction

Les **endo-**nucleases

I-2 ADN polymerases

Taq polymérase

I-3 Les ligases

## II Les vecteurs

II-1 Vecteur de clonage

II-2 Vecteur d'expression

## III Les sondes moléculaires

## IV Les Techniques

IV-1 Technique d'**électrophorèse** sur gel d'agarose

IV-2 Technique **PCR**

IV-3 Technique de **séquençage**

IV-4 Southern **blot**

## V-Applications

## I-1Les Enzymes de restriction

Ce sont des endonucleases extraites à partir de microorganismes

(généralement des bactéries) et qui coupent les liaisons

phospho-diester au niveau des acides nucléiques.

# les endonucléases

Elles coupent l'ADN à l'intérieur en cassant les liaisons phospho-diester.

coupent au niveau de sites spécifiques appelés « **sites de restrictions** »,

ces sites sont de **nature palindromique,** c'est-à-dire que la lecture

des deux brins complémentaires dans **des sens opposés donne la**

**même séquence**.

5’ ATGCTAGATAGCAT 3’

3’ TACGATCAATCGTA 5’

**Séquence palindromique**

# endo-nucléases

Il y a deux catégories d'endo-nucléases : celles qui donnent des **extrémités franches** et celles qui donnent **des extrémités cohésives**. d'où la possibilité de lier des fragments d'ADN d'origine différentes : c'est le phénomène de la recombinaison génétique.

5'ATCGCGTTACGCGTAACGCGAT3'
3'TAGCGCAATGCGCATTGCGCTA5'

5'ATCGCGTTACGCGTAACGCGAT3'
3'TAGCGCAATGCGCATTGCGCTA5'

5'ATCGCGTTACG3' 5'CGTAACGCGAT3'
3'TAGCGCAATGC5' 3'GCATTGCGCTA5'

5'ATCG3' 5'CGTTACGCGTAACGCGAT3'
3'TAGCGCAATGCGCATTGC5' 3'GCTA5'




Extremites cohesives

Figure 2 : les deux types d'endonucléases

H.Belhocine

Tableau 1: exemple de quelques exo nucléase et leurs origines

| Enzyme | microorganisme | SITE DE RESTRICTION |
|---|---|---|
| *EcoRI* | *Echerichia coli* | ↓ GAATTC CTTAAG ↑ |
| *Eco RII* | *Echerichia coli* | ↓ GCCTGGC CGGACCG ↑ |
| *PstI* | *Providentia stuartii* | ↓ CTGCAG GACGTC ↑ |
| *HindIII* | *Haemophilus influenzae* | ↓ AAGCTT TTCGAA ↑ |

**Il existe trois types d'enzymes de restriction.**

**Les enzymes de type I et III** ne sont pas utilisées en pratique, car elles coupent l'ADN de façon aléatoire.

**Les enzymes de restriction de type II**, clivent spécifiquement les deux brins d'ADN au niveau d'une séquence bien définie. Elles ont la particularité de reconnaitre et de couper des **séquences palindromiques**

# I - Les Enzymes I-2 ADN polymerases

- **Taq polymérase :**

extraite à partir d'une bactérie Thermus aquaticus , Active à 70°C, utilisée dans la technique PCR, en vue d'une amplification de l'ADN in vitro.

# I - Les Enzymes -3 Les ligases

Elles réalisent des liaisons phospho-diester, pour souder deux segments d'ADN. (Fig.4)

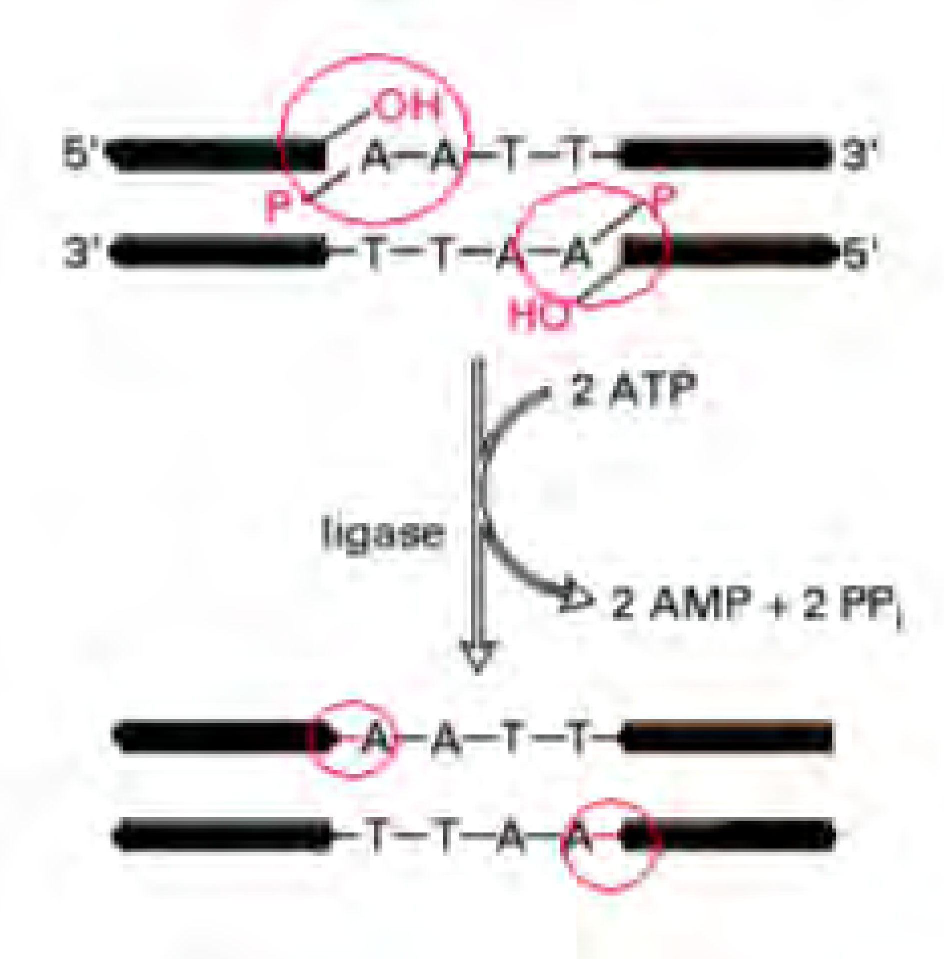



Figure 4 : réalisation de liaisons phosphodiesters par la ligase

[redacted]

Ce sont [redacted] construites à partir de plasmides ou de virus (cosmides), qui permettent le transfert de gènes entre cellules.

Tous les vecteurs possèdent un poly-linker refermant plusieurs sites de restriction, où on peut ouvrir le vecteur pour insérer une séquence d'ADN et un gène de résistance aux antibiotiques.

Le gène de résistance permet de sélectionner les cellules qui ont reçu le vecteur après transfection.

Il existe deux grandes catégories de vecteurs :

# II-1 Vecteur de clonage

renferme une origine de réplication (Ori V ( il permet de cloner un segment d'ADN ou un gène qui y est intégré. Schémas simplifié (Figure 5)




Figure 5 : vecteur de clonage

# II-2 Vecteur d'expression :

- Renferme un promoteur, il permet de faire exprimer un gène Schéma simplifié  (Figure 6)




**Figure 6** : vecteur d'expression

# III Les sondes moléculaires

- Séquence **d'ADN monocaténaire**, marquée, complémentaire du gène recherché, son rôle est la **détection de gènes,** notamment **en diagnostic génétique**.

- Le principe consiste à **détecter la présence d'une mutation** ponctuelle en réalisant l'hybridation moléculaire entre la séquence à tester et la sonde de l'allèle muté, L'utilisation d'une sonde spécifique de l'allèle normal et nécessaire pour réaliser un témoin négatif.

- Pour s'hybrider de façon spécifique à la séquence complémentaire, la sonde doit être courte. Les sondes sont marquées avec un élément radioactif (P32) ou chimioluminescent (digoxygénine) pour pouvoir les détecter après hybridation.

# IV Les Techniques

- IV-1 Technique d'**électrophorèse** sur gel d'agarose
- IV-2 Technique **PCR**
- IV-3 Technique de **séquençage-sanger-**
- IV-4 Southern **blot**

# IV-1 **Technique d'électrophorèse sur gel d'agarose**

- L'ADN génomique est fragmenté par une enzyme de restriction.

- Le produit de la digestion est ensuite migré sur le gel d'agarose par électrophorèse afin de séparer les fragments de restriction en fonction de leurs poids moléculaires.




Fig.7 : Technique d'électrophorèse

# IV-2 Technique PCR :

Permet d'amplifier de courtes séquences d'ADN (quelques kilobases) in vitro, à partir d'une très petite quantité d'ADN même issue d'une seule cellule, par une série de cycles se déroulant en trois étapes : dénaturation, hybridation de l'amorce, réplication. Le nombre de molécule obtenu après n cycles et 2n. (Figure 8)

- Dénaturation : l'ADN à amplifier est dénaturé à la chaleur, les deux brins se séparent et servent de matrice.

- Hybridation des amorces : on baisse la température pour permettre à l'amorce de s'hybrider spécifiquement aux extrémités de la séquence cible à amplifier.

- Elongation ou polymérisation à 70 °C : à cette température optimale de l'activité de l'enzyme Taq polymérase, l'amorce est allongée par complémentarité au brin matrice, ce qui produit deux nouvelles molécules d'ADN.

# IV-2 Technique PCR :

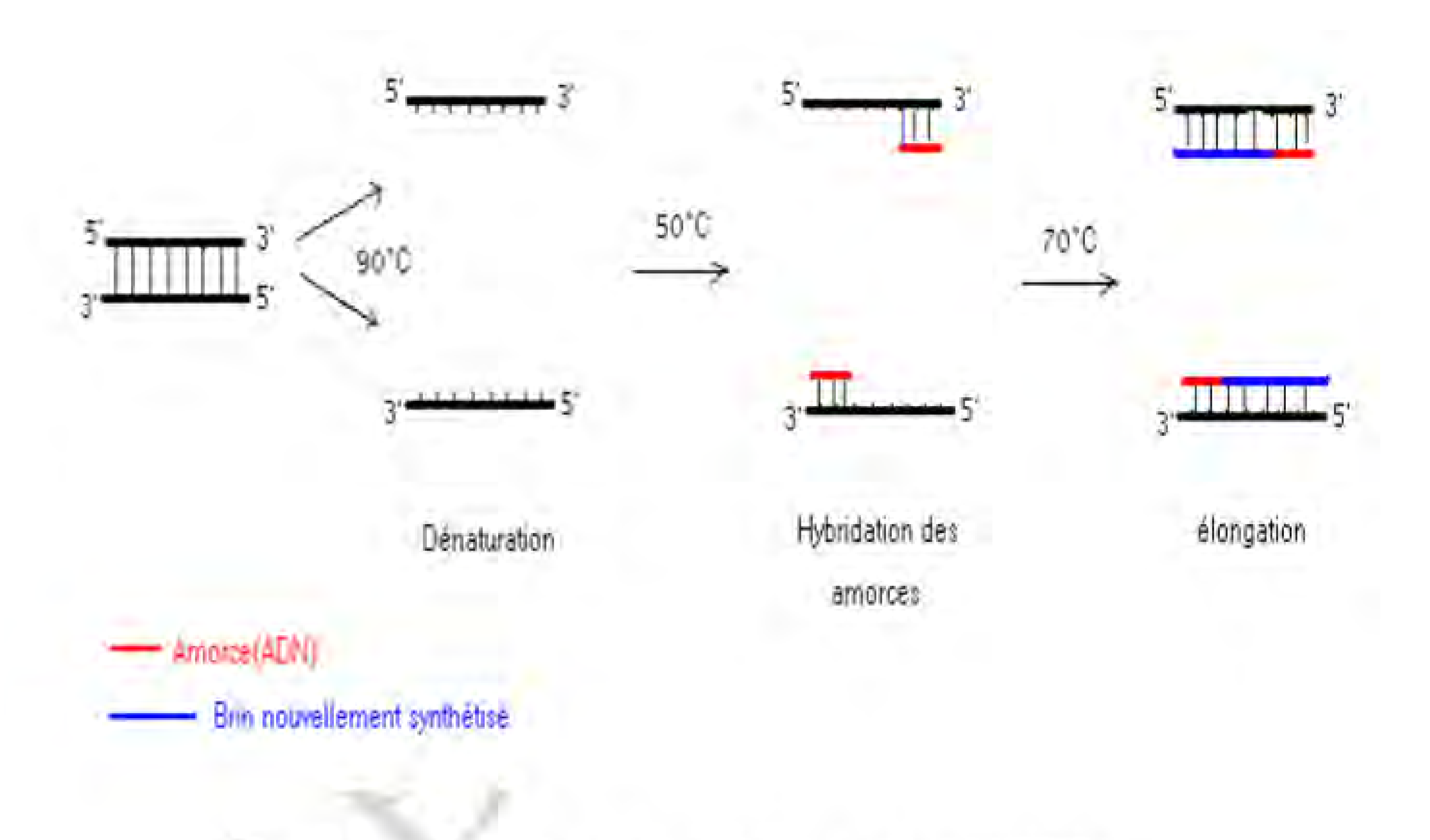



**Figure 8 :** représentation schématique des 3 étapes d'un cycle PCR

# IV-3 Technique de séquençage-Sanger-

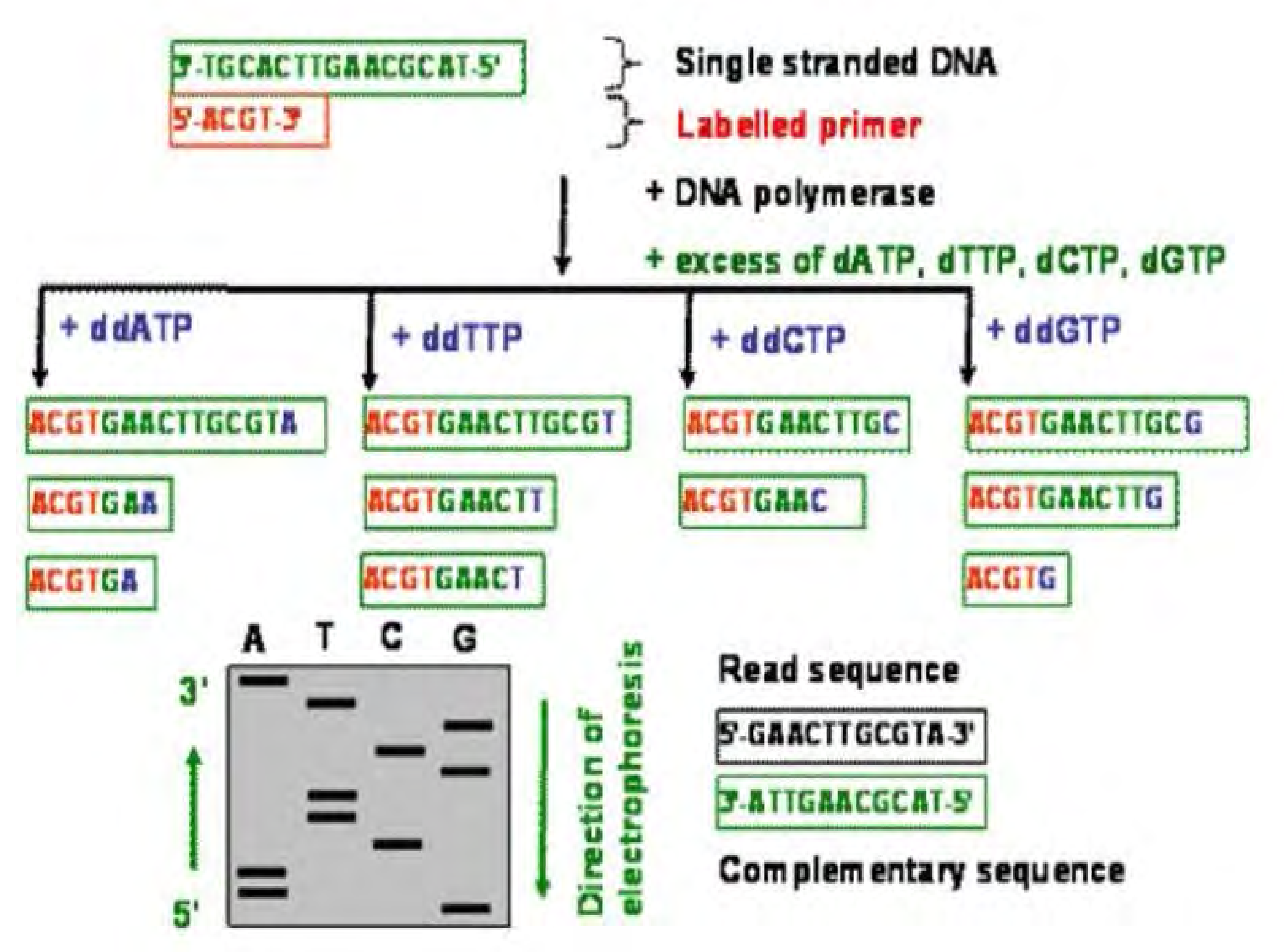
permet de déterminer la séquence d'ADN en réalisant une série de réplication

il faut

- 4 synthèses du brin complémentaire
- des amorces d'où les synthèses débutent
  - Les ADNs polymérase I : catalyse la synthèse
  - Des nucléosides triphosphate (+ $Mg^{2+}$) : dATP , dCTP , dGTP et dTTP
  - Des didésoyribonucléoside triphosphate marqué (radioactivité) : dd ATP, ddCTP ddGTP, et ddTTP; ne possèdent pas de groupement OH en 2' ni en 3', Ils bloquent donc la synthèse lorsqu'ils sont incorporés au brin.

Ainsi on utilisant différents didésoxynucléotides (ddA, ddT, ddG, ddC) on obtient plusieurs fragments se terminant chacun par l'un des didé-soxynucléotides.

Après séparation des brins néo synthétisés et leur migration sur gel d'électrophorèse, chaque fragment indique la position d'une base au niveau du brin néosynthétisé (brin lu) dont l'ordre est donné par sa position sur le gèle d'électrophorèse (Figure 9).


3'-TGCACTTGAACGCAT-5'
5'-ACGT-3'
Single stranded DNA
Labelled primer
+ DNA polymerase
+ excess of dATP, dTTP, dCTP, dGTP
+ ddATP
+ ddTTP
+ ddCTP
+ ddGTP
ACGTGAACTTGCGTA
ACGTGAA
ACGTGA
ACGTGAACTTGCGT
ACGTGAACTT
ACGTGAACT
ACGTGAACTTGC
ACGTGAAC
ACGTGAACTTGCG
ACGTGAACTTG
ACGTG
A T C G
3'
5'
Direction of electrophoresis
Read sequence
5'-GAACTTGCGTA-3'
3'-ATTGAACGCAT-5'
Complementary sequence

# IV-4 Southern blot

Le but de la technique est le transfert de l'ADN du gel sur une feuille de nitrocellulose ou de nylon afin de visualiser des séquences précises par hybridation moléculaire avec une sonde marquée.

1. Fragmentation de l'ADN par une endonucleases
2. Séparation des fragments de restrictions en fonction du poids moléculaire (électrophorèse sur gel d'agarose)
3. Transfert des fragments du gel sur une feuille de nitrocellulose(ou membrane de nylon) (fig.10)
4. Dénaturation de l'ADN fixé sur la membrane.
5. Mise en contacte de l'ADN et des sondes marquées en milieu liquide et sous agitation.
6. Lavage de la feuille pour éliminer les hybridations non spécifiques.
7. Visualisation des sondes fixées par autoradiographie.

# IV-4 Southern blot :

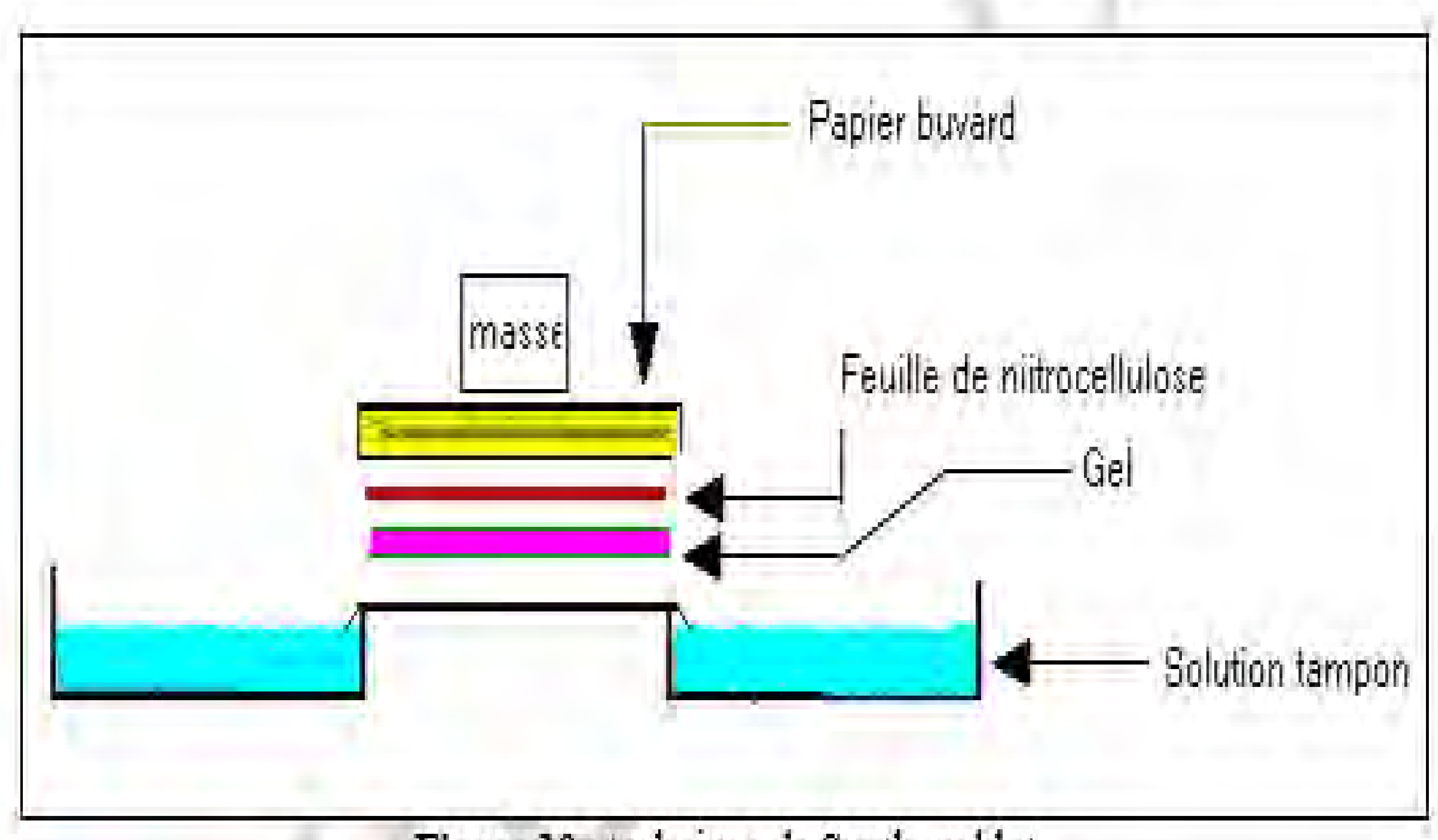



Figure 10 : technique de Southern blot

# V-Applications

-Detection des mutations génétiques(dgc des maladies génétiques) et detection des polymorphismes genetiques(test de paternité,identification dans les catastrophes naturelles et en criminologie)

-Thérapie génique(vu en td)

- Synthèse de molécules thérapeutiques(vu en td)